

Раздел 2
**СЕЛЕКЦИЯ, СЕМЕНОВОДСТВО,
И БИОТЕХНОЛОГИЯ**

УДК 577.2:633.72

doi: 10.31360/2225-3068-2023-86-152-161

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ
ДЛЯ АНАЛИЗА ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ
РАСТЕНИЙ ЧАЯ (*CAMELLIA SINENSIS* (L.) KUNTZE)**

Мацькив А.О., Гвасалия М.В.

*Федеральный исследовательский центр
«Субтропический научный центр Российской академии наук»,
г. Сочи, Россия, e-mail: m.v.gvasaliya@mail.ru*

*Мацькив А.О. orcid.org/0000-0002-6851-242X
Гвасалия М.В. orcid.org/0000-0001-7394-4377*

Геномные и транскриптомные технологии позволяют раскрыть фундаментальную основу наследования ценных признаков и повышают эффективность селекционного процесса. В настоящее время решение вопросов по селекции чая уже не может обойтись без применения биотехнологических и генетических инструментов. В результате их интеграции в селекционные программы уже достигнут определённый прогресс в получении новых сортов, превосходящих исходные не только по показателям продуктивности и качества, но и устойчивости к абиотическим факторам среды. В настоящем исследовании апробированы наборы праймеров и выявлены эффективные молекулярные маркеры (SSR, ISSR, SCoT) для анализа генетического разнообразия и генотипирования коллекции гермоплазмы чая ФИЦ ШЦ РАН. Из 36 SCoT-праймеров – 25 показали низкое качество амплификации и слабые размытые бэнды, впоследствии были исключены из анализа. Оставшиеся 11 SCoT-праймеров генерировали воспроизводимые результаты с чётким полиморфизмом и разрешающей способностью для генотипов чая. В коллекции сортов и мутантных форм чая средний уровень полиморфизма составил 55 %. Анализ генетических дистанций по SCoT-маркерам показал отсутствие чёткой кластеризации по признаку – размер листовой пластинки, что может говорить о наличии одной ветви родословной для генотипов группы ‘extra-large’ с возможной примесью ассамского подвида чая. Результаты проверки хлоропластных праймеров показали одинаковую длину амплифицированных фрагментов у китайской и ассамской разновидностей чая. Вместе с тем, по четырём хлоропластным праймерам (Chlo2, 5, 8, 17) выявлены различия по кривым плавления амплифицированных фрагментов. Наличие двух гаплотипов в коллекции чая показано тремя из этих маркеров, у которых ампликоны различаются по температуре плавления, а тепловые карты отражают присутствие двух различных групп в коллекции чая.

Ключевые слова: *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, гермоплазма чая, генетическое разнообразие, молекулярные маркеры, амплификация фрагментов, генотипирование.

Введение. Коллекции геноресурсов в атипичных регионах произрастания являются важным источником генетического разнообразия для селекционного усовершенствования и фундаментальных исследований. Пограничные регионы произрастания могут быть важным ресурсом новых признаков и варибельности, расширяющим генетический потенциал устойчивости культур к абиотическим факторам, делая их более адаптивными к новым условиям среды [3]. Районированные генотипы в таких регионах произрастания имеют преимущества для использования в селекции и легче размножаются, по сравнению с новыми генотипами, завезёнными из дальних регионов. Поэтому доместифицированные генетические ресурсы в атипичных регионах произрастания важны для сохранения, изучения и целенаправленной селекции. Однако для этого необходима полная характеристика генетического разнообразия коллекций районированных генотипов, которые доместифицировались в атипичных регионах произрастания [2, 3].

Западный Кавказ – один из наиболее северных регионов, в которых возможно промышленное выращивание чая в мире. Интродукция его в регион была начата в 80-х годах XIX века. На базе собранных коллекций целенаправленные исследования по селекции ведутся с 1930-х гг. За более чем 150-летнюю историю выращивания чайного растения на Кавказе выведены линейки районированных генотипов. Сохраняемая коллекция геноресурсов чая включает: сорта-популяции старой зарубежной и отечественной селекции, отечественные сорта, многочисленные гибриды, индуцированные мутантные формы. Особый интерес в этой коллекции представляют генотипы, отличающиеся не только высокой урожайностью и качеством готовой продукции, но и высоким адаптивным потенциалом, устойчивостью к дефициту влаги и пониженным температурам [1]. Однако, следует отметить, что генетические механизмы их доместикации, а также внутривидовое и межвидовое генетическое разнообразие, популяционная структура, филогенетические связи между генотипами этой ценной культуры в нашем регионе остаются не изученными.

Традиционная селекция древесных культур – долгий процесс и связан в первую очередь с длительным ювенильным периодом. Для получения и оценки фенотипа и генотипа гибридного потомства растений чая может понадобиться в среднем 10–25 лет. Кроме этого, ряд биологических особенностей затрудняет селекционный процесс. К примеру, долгий ювенильный период, низкая эффективность завязываемости семян, всё это затрудняет

традиционную селекцию [1]. Геномные и транскриптомные технологии, разработанные для многих культур за рубежом, позволяют повысить эффективность отбора и гибридизации и раскрыть фундаментальную основу наследования важных признаков [14, 23, 24]. Зарубежная селекция чая в настоящее время не обходится без биотехнологических и генетических инструментов. В результате их интеграции в селекционные программы достигнут определённый прогресс и уже получено много сортов, превосходящих старые сорта по показателям продуктивности, качества и устойчивости к неблагоприятным условиям среды [16, 17].

В последние годы за рубежом разработаны молекулярные инструменты характеристики гермоплазмы различных культур, которые в основном базируются на полиморфизме RAPD [14], микросателлитов (SSR) [20], сиквенсов ITS [18], SRAP-, IRAP-, REMAP-полиморфизмах [12], старт-кодон целевых маркерах (SCoT) [25] или маркерах цитоплазматической ДНК (orgDNA) [10].

Среди различных типов ДНК-маркеров, кодоминантные ядерные микросателлиты (ncSSRs) имеют ряд преимуществ для оценки различий на уровне вида и популяции, таких как локус-специфичность, высокая воспроизводимость, высокая степень полиморфизма, техническая простота [13]. Однако недостатком этого типа маркеров может являться гомоплазия, из-за чего генетические различия в коллекциях могут быть недооценены [5]. Кроме того многие субтропические культуры характеризуются сложным кариотипом, присутствием полиплоидии. Поэтому сочетание различных типов молекулярных маркеров могут быть более эффективным подходом, чем использование одного типа маркеров. Одним из эффективных типов мультилокусных маркеров, основанных на полиморфизме между SSR-регионами генома, является ISSR. Преимущества этих маркеров – высокая степень воспроизводимости и высокая степень полиморфизма [16], что позволяет эффективно выявлять различия между близкородственными генотипами. Однако связь с признаками по таким маркерам установить сложно. Сравнительно недавно разработанные мультилокусные маркеры типа SCoT имеют преимущество в этом отношении, попадая в кодирующие участки генома они позволяют выявить связь маркер/признак [6]. Наконец, маркеры на основе цитоплазматической (митохондриальной и хлоропластной) ДНК позволяют выявить наследование в коллекциях, в том числе основные гаплотипы, уточнить происхождение ценных генотипов и оценить примеси в них [8].

В случаях, когда полногеномное секвенирование недоступно, и референсные полногеномные сиквенсы для многих культур всё ещё отсутствуют из-за больших размеров их геномов и высокой степени гетерозиготности,

сочетание различных типов молекулярных маркеров может помочь охарактеризовать коллекцию и прояснить происхождение важных генотипов в ней. Полученные данные будут важны для совершенствования стратегий консервации и разработки новых селекционных программ, направленных на увеличение генетического разнообразия в коллекциях.

Для выявления эффективных наборов маркеров необходима их апробация на коллекции чая. В связи с этим, **цель исследований** – провести апробацию маркеров и оптимизировать протоколы генотипирования для анализа генетического разнообразия растений чая, находящихся в коллекции нашего центра.

Объекты и методы исследований. В качестве объектов исследования выбраны растения чая, находящиеся в полевой коллекции геноресурсов ФИЦ СНЦ РАН.

Генотипирование проведено методом классической ПЦР, с применением капиллярного электрофореза. Основные наборы маркеров: ISSR [16], SSR [11, 19, 20, 22], SCoT [21,26], CpDNA [15, 18]. Выделение ДНК основано на методе ЦТАБ с модификациями [7]. Проверка качества ДНК проводилась с использованием метода электрофореза в 1%-ном агарозном геле. Концентрацию ДНК определяли спектрофотометрическим методом. Для разработки праймеров с использованием NCBI Primer Blast и Primer3Plus применялись методы *in silico* [20]. Анализ генетических дистанций в коллекциях проводился методом Neighbor Joining, с использованием DarWIN6.0. Анализ структуры популяций – методами байесовской статистики в программе STRUCTURE и методом основных координат PCoA (расширение GeneAlex) [9]. Анализ гаплотипов в коллекциях проводился по частотам аллелей в программе HarpAnalyzer [8]. Параметры эффективности мультилокусных маркеров анализировали в программе IMES [4]. Поиск корреляций между фенотипом и генотипом – методом основных компонент, с применением коэффициентов попарного сходства Спирмена (XlStat) [27].

Результаты и их обсуждение. Из 36 SCoT-праймеров, 25 праймеров (SCoT1, 2, 9, 10, 11, 13–16, 18–24, 27–32, 34–36) показали низкое качество амплификации и слабые размытые бэнды и были исключены из анализа. Оставшиеся 11 SCoT-праймеров (SCoT3, SCoT4, SCoT5, SCoT6, SCoT7, SCoT8, SCoT12, SCoT17, SCoT25, SCoT26, SCoT33) генерировали воспроизводимые результаты с чётким полиморфизмом и разрешающей способностью для генотипов чая. В коллекции сортов и мутантных форм чая (56 образцов) всего было получено 194 бэнды и средний уровень полиморфизма составил 55 %. В среднем было получено 15,9 бэндов на праймер, и варьировало от $Na = 10$ (SCoT26) до $Na = 20$ (SCoT5) (табл. 1).

Таблица 1. Параметры генетического разнообразия SCoT-маркеров для анализа генетического разнообразия растений чая *Camellia sinensis* (L.) Kuntze

Table 1. Parameters of the genetic diversity of SCoT markers for the analysis of the genetic diversity of *Camellia sinensis* (L.) Kuntze tea plants

Маркер	Последовательность праймеров	N	Na	P, %	PIC	D	H
SCoT3	CAACAATGGCTACCACCG	59	12,00	53,5	0,18	0,72	0,52
SCoT5	CAACAATGGCTACCACGA	58	20,00	48,2	0,19	0,78	0,53
SCoT6	CAACAATGGCTACCACGC	59	11,00	58,3	0,19	0,67	0,50
SCoT7	CAACAATGGCTACCACGG	60	19,00	52,7	0,17	0,72	0,50
SCoT8	CAACAATGGCTACCACGT	60	19,00	57,2	0,18	0,67	0,49
SCoT17	ACCATGGCTACCACCGAG	60	17,00	59,8	0,18	0,64	0,48
SCoT25	ACCATGGCTACCACCGGG	60	17,00	55,9	0,18	0,69	0,49
SCoT4	CAACAATGGCTACCACCT	60	15,00	53,3	0,17	0,72	0,50
SCoT33	CCATGGCTACCACCGCAG	59	19,00	57,1	0,19	0,68	0,51
SCoT12	ACGACATGGCGACCAACG	60	16,00	50,3	0,18	0,75	0,50
SCoT26	ACCATGGCTACCACCGTC	59	10,00	58,8	0,19	0,67	0,50
Mean \pm SD		59,4 \pm 0,7	15,9 \pm 3,5	55,0 \pm 3,7	0,2 \pm 0,0	0,7 \pm 0,0	0,5 \pm 0,0

*Примечание: *Na* = No различных бэндов; *P* – процент полиморфных бэндов; *PIC* – информационное содержание полиморфизма; *D* – разрешающая способность – вероятность того, что два случайно выбранных генотипа имеют различие и отличимы друг от друга; *H* – индекс разнообразия – вероятность того, что генотип гетерозиготен по локусу в популяции; Mean \pm SD – среднее и стандартное отклонение

В результате исследований был отмечен низкий уровень полиморфизма для SCoT-маркеров, по средним показателям он составил – $PIC = 0,2$. Вместе с тем в коллекции растений чая не было обнаружено идентичных ДНК-фингерпринтов. Более того, у 56 генотипов чая были обнаружены уникальные фрагменты SCoT, большая часть из которых принадлежит к группе индуцированных мутантных форм, полученных в результате гамма-облучения (дозой 15 грэй) семян сорта-популяции ‘Кимынь’ и сорта ‘Колхида’.

В другом блоке исследований была предпринята попытка проанализировать генетические дистанции между крупнолистными и мелколистными генотипами чая. С этой целью коллекцию мутантных форм ранжировали в соответствии с общепринятой классификацией по возрастанию площади листовой пластинки, характерной для типично вызревшего листа. В результате по этой позиции в коллекции обнаружены и выделены три

группы по площади листовой пластинки: «средняя» (до 40 см²), «крупная» (40–60 см²) и «экстра-крупная» (более 60 см²). Анализ генетических дистанций по SCoT-маркерам показал отсутствие чёткой кластеризации по этому признаку (рис. 1).

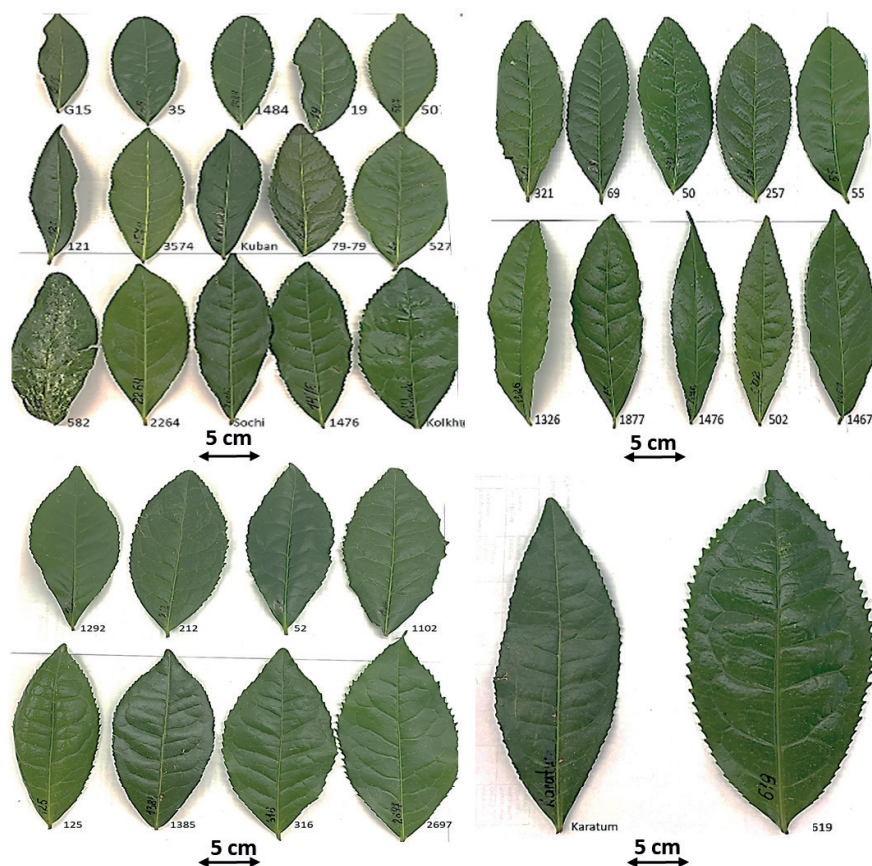


Рис. 1. Ранжирование коллекции мутантных форм чая по площади листовой пластинки

Fig. 1. Ranging the collection of tea mutant forms by the leaf blade area

Большая часть генотипов, относящаяся к группе «крупная» (синие точки на диаграмме PCoA) равномерно распределена по координатам. Однако почти все генотипы группы «экстра-крупная» (красные точки на диаграмме PCoA) смещены влево, а группы «средняя» (оранжевые точки на диаграмме PCoA) – вправо (рис. 2). Следовательно, можно предположить наличие одной ветви родословной для генотипов группы «экстра-крупная», и возможные примеси ассамского подвида чая *C. sinensis* var. *assamica*. В дальнейшем планируется провести более глубокий анализ этой коллекции.

С целью поиска маркеров, различающих ассамскую и китайскую разновидность чая разработаны 50 пар хлоропластных праймеров на основе полного сиквенса хлоропластного генома, размещённого в NCBI (The National Center for Biotechnology Information). Однако результаты проверки этих праймеров *in silico* через Primer Blast показали, что все они амплифицируют фрагменты одинаковой длины, как у *Camellia sinensis* var *sinensis*, так и *Camellia sinensis* var. *assamica*.

Несмотря на это, были выявлены различия по показателям кривым плавления амплифицированных фрагментов по четырём из 50-ти разработанных хлоропластных праймеров (Chlo2, 5, 8, 17) (рис. 3).

Наличие двух гаплотипов в коллекции чая показано тремя из этих маркеров, у которых ампликоны различаются по температуре плавления и тепловые карты отражают присутствие двух различных групп в коллекции чая (рис. 4).

В дальнейшем планируется продолжить эти исследования, провести повторный анализ результатов с использованием капиллярного фрагментного анализа.

Выводы. Проведено генотипирование базовой коллекции чая. Выявлены эффективные хлоропластные и SCoT-маркеры для изучения и оценки гермоплазмы чая *Camellia sinensis* (L.) Kuntze. Из 36 SCoT-праймеров – 11 генерировали полиморфизм, со средним показателем 55 %. В коллекции растений чая не было идентичных ДНК-фингерпринтов. У 56 генотипов чая обнаружены уникальные фрагменты SCoT, принадлежащие к группе индуцированных мутантных форм. 3 хлоропластных маркера, по температуре плавления и тепловым картам показали наличие в коллекции двух гаплотипов – ассамской и китайской разновидности чая.

Публикация подготовлена в рамках реализации
ГЗ ФИЦ СХЦ РАН № FGWR-2021-0008

Список литературы/References

1. Гвасалия М.В. Спонтанные и индуцированные сорта и формы чая (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) во влажных субтропиках России и Абхазии, перспективы их размножения и сохранения в культуре *in vitro*. Канд. дис. Краснодар: КубГАУ, 2015. [Gvasaliya M.V. Spontaneous and induced varieties and forms of tea (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) in the humid subtropics of Russia and Abkhazia, prospects for their reproduction and preservation in *in vitro* culture. Cand. dis. Krasnodar: KubGAU, 2015. (In Rus)].
2. Мацькив А.О., Конинская Н.Г., Шуркина Е.С. Анализ генетического разнообразия популяций чая на Западном Кавказе, Субтропическое и декоративное садоводство. 2022; 80 : 78-84. DOI: 10.31360/2225-3068-2022-80-78-84. [Matskiv A.O., Koninskaya N.G., Shurkina E.S. Analysis of the genetic diversity of tea populations in the Western Caucasus. Subtropical and ornamental horticulture. 2022; 80 : 78-84. (In Rus)]. DOI: 10.31360/2225-3068-2022-80-78-84.
3. Рындин А.В., Мохно В.С. Основные направления в селекции садовых культур на Черноморском побережье Краснодарского края, Субтропическое и декоративное са-

- доводство. 2011; 45 : 140-149. [Ryndin A.V., Mokhno V.S. The main directions in the selection of horticultural crops on the Black Sea coast of the Krasnodar Territory. Subtropical and ornamental horticulture. 2011; 45 : 140-149. (In Rus)].
4. Amiryousefi A., Hyvönen J., Poczai P. iMEC: Online Marker Efficiency Calculator, Applications in Plant Sciences. 2018; 6(6) : e01159. DOI: 10.1002/aps3.1159.
 5. Barkley N.A., Krueger R.R., Federici C.T., Roose M.L. What phylogeny and gene genealogy analyses reveal about homoplasy in citrus microsatellite alleles, Plant Systematics and Evolution. 2009; 282(1-2) : 71-86.
 6. Collard B. C.Y., Mackill D.J. Start Codon Targeted (SCoT) Polymorphism: A Simple, Novel DNA Marker Technique for Generating Gene-Targeted Markers in Plants, Plant molecular biology reporter. 2009; 27(1) : 86-93. DOI: 10.1007/s11105-008-0060-5.
 7. Doyle J.J. Isolation of plant DNA from fresh tissue, Focus. 1990; 12 :13-15.
 8. Eliades N.-G., Eliades D. Haplotype Analysis: software for analysis of haplotype data, Genetics and Forest Tree Breeding. 2009. DOI: 10.13140/RG.2.2.19029.93922.
 9. Evanno G., Regnaut S., Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study, Molecular Ecology. 2005; 14(8) : 2611-2620. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x.
 10. Fu J., Liu H., Hu J., Liang Y., Liang J., Wuyun T., Tan, X. Five Complete Chloroplast Genome Sequences from Diospyros: Genome Organization and Comparative Analysis, Plos one. 2016; 11(7) : e0159566. DOI: 10.1371/journal.pone.0159566.
 11. Golein B., Bigonah M., Azadvar M., Golmohammadi M. Analysis of genetic relationship between 'Bakraee' (*Citrus* sp.) and some known Citrus genotypes through SSR and PCR-RFLP markers, Scientia Horticulturae. 2012; 148 : 147-153. DOI: 10.1016/j.scienta.2012.10.012.
 12. Guan Ch, Chachar S., Zhang P., Hu Ch., Wang R., Yang Y. Inter- and Intra-specific Genetic Diversity in Diospyros Using SCoT and IRAP Markers, Horticultural Plant Journal. 2020; 6(2) : 71-80. DOI: 10.1016/j.hpj.2019.12.005.
 13. Kalia R., Rai M., Kalia S., Singh R., Dhawan A. Microsatellite markers: An overview of the recent progress in plants, Euphytica. 2011; 177(3) : 309-334. DOI: 10.1007/s10681-010-0286-9.
 14. Lamine M., Mliki A. Elucidating genetic diversity among sour orange rootstocks: a comparative study of the efficiency of RAPD and SSR markers, Applied biochemistry and biotechnology. 2015; 175(6) : 2996-3013. DOI: 10.1007/s12010-015-1477-6.
 15. Li W., Liu Y., Yang Y., Xie X., Lu Y., Yang Z., Jin X., Dong W., Suo Z. Interspecific chloroplast genome sequence diversity and genomic resources in Diospyros, BMC Plant Biol. 2018; 18(1) : 210. DOI: 10.1186/s12870-018-1421-3.
 16. Mondal T.K. Assessment of genetic diversity of tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) by inter simple sequence repeat polymerase chain reaction, Euphytica. 2002; 128(3) : 307-315. DOI: 10.1023/A:1021212419811.
 17. Mukhopadhyay M., Mondal T.K., Chand P.K. Biotechnological advances in tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze): a review, Plant Cell Rep. 2016; 35(2) : 255-287. DOI: 10.1007/s0029 9-015-1884-8.
 18. Morton C.M. Phylogenetic relationships of the Aurantioideae (Rutaceae) based on the nuclear ribosomal DNA ITS region and three noncoding chloroplast DNA regions, atpB-rbcL spacer, rps16, and trnL-trnF, Organisms Diversity & Evolution. 2009; 9(1) : 52-68. DOI: 10.1016/J.ODE.2008.11.001.
 19. Naval M.M., Zuriaga E., Pecchioli S., Llácer G., Giordani E., Badenes M.L. Analysis of genetic diversity among persimmon cultivars using microsatellite markers, Tree Genetics & Genomes. 2010; 6(5) : 677-687. DOI: 10.1007/s11295-010-0283-0.
 20. Pinar H., Yildiz E., Kaplankiran M., Unlu M., Serce S., Ersizli S. Molecular characterization of some selected persimmon genotypes and cultivars by SRAP and SSR markers, Genetika. 2017; 49(2) : 693-704. DOI: 10.2298/GENSR1702693P.
 21. Primer3web URL: <https://primer3.ut.ee/> The link is active on 01.09.2023.
 22. Reddy P.M., Sarla N., Siddiq E. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding, Euphytica. 2002; 128 (1) : 9-17. DOI: 10.1023/A: 1020691618797.
 23. Samarina L.S., Bobrovskikh A.V., Doroshkov A.V., Malyukova L.S., Matskiv A.O.,

- Rakhmangulov R.S., Koninskaya N.G., Malyarovskaya V.I., Tong W., Xia E., Manakhova K.A., Ryndin A.V., Orlov Y.L. Comparative Expression Analysis of Stress-Inducible Candidate Genes in Response to Cold and Drought in Tea Plant [*Camellia sinensis* (L.) Kuntze], *Front Genet.* 2020; 11 : 611283. DOI: 10.3389/fgene.2020.611283.
24. Snelling J.W., Sathuvalli V.R., Colburn B.C., Bhattarai G., Rowley E.R., Mockler T.C., Sasaki C.A., Copetti D., Mehlenbacher S.A. Genomic resource development in hazelnut breeding, *ActaHortic.* 2018, 39-46. DOI: 10.17660/ActaHortic.2018.1226.5.
25. Xia E.H., Li F.D., Tong W. Tea Plant Information Archive, 2019, URL: <http://tpia.teaplant.org/>The link is active on 01.09.2023.
26. Yang Y., Yang T., Jing Zh. Genetic diversity and taxonomic studies of Date plum persimmon (*Diospyros lotus* L.) using Morphological Traits and SCoT Markers, *Biochemical Systematics and Ecology.* 2015; 61(4) : 253-259. DOI: 10.1016/j.bse.2015.06.008.
27. XLSTAT [Electronic resource] data analysis add-in for Excel URL: <https://www.xlstat.com/es/>

**MOLECULAR MARKERS EFFICIENCY
FOR THE ANALYSIS OF GENETIC DIVERSITY OF TEA PLANTS
(*CAMELLIA SINENSIS* (L.) KUNTZE)**

Matskiv A.O., Gvasaliya M.V.

*Federal Research Centre
the Subtropical Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences,
Russia, Sochi, e-mail: m.v.gvasaliya@mail.ru*

Genomic and transcriptomic technologies allow revealing the fundamental basis of inheritance of valuable traits and increasing the efficiency of the breeding process. Currently, the solution of tea breeding problems can no longer do without the use of biotechnological and genetic tools. As a result of their integration into breeding programs, some progress has already been made in obtaining new cultivars that surpass the original ones not only in terms of productivity and quality, but also in resistance to abiotic environmental factors. In this study, sets of primers have been tested and effective molecular markers (SSR, ISSR, SCoT) have been identified for the analysis of genetic diversity and genotyping of the collection of tea germplasm in FRC SSC of RAS. From 36 SCoT primers, 25 showed poor amplification quality and weak fuzzy bands, which were subsequently excluded from the analysis. The remaining 11 SCoT primers generated reproducible results with clear polymorphism and resolution for tea genotypes. In the collection of cultivars and mutant tea forms, the average level of polymorphism was 55 %. The analysis of genetic distances by SCoT markers showed the absence of a clear clustering on the basis of the leaf blade size, which may indicate the presence of one branch of the pedigree for the genotypes of the 'extra-large' group with a possible admixture of the Assam tea subspecies. The results of chloroplast primers testing showed the same length of amplified fragments in Chinese and Assam tea cultivars. At the same time, four chloroplast primers (Chlo2, 5, 8, 17) revealed differences in the melting curves of amplified fragments. The presence of two haplotypes in tea collection is shown by three of these markers, whose amplicons differ in melting temperature, and heat maps reflect the presence of two different groups in the tea collection.

Key words: *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, tea germplasm, genetic diversity, molecular markers, fragment amplification, genotyping.